

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 21, 1983, pp. 279–286

## Diagnostische Wertigkeit der Lysozymaktivität bei neurologischen Erkrankungen in Liquor und Serum

Von U. Kauerz und B. Weisner

Neurologische Universitäts-Kernklinik mit Poliklinik (Direktor Prof. Dr. K. Kunze) der Universität Hamburg

(Eingegangen am 19. Januar/1. Dezember 1982)

**Zusammenfassung:** Die Lysozymaktivität wurde an Hand der Lyse von Bakterienzellwänden bei *Micrococcus lysodeicticus* mit der Lysoplate-Methode und mit der Turbidimetrie bestimmt. Beide Methoden wurden miteinander verglichen.

Die Lysozymaktivität in Liquor und Serum wurde bei Referenzpersonen ( $n = 57$ ) und bei Patienten mit bakteriellen Meningoencephaliden ( $n = 20$ ), akuten viralen Meningoencephaliden ( $n = 29$ ), multipler Sklerose ( $n = 19$ ), chronischen Entzündungen ( $n = 29$ ), Subarachnoidalblutungen ( $n = 4$ ), Diskusprotrusionen ( $n = 12$ ), Polyneuropathien ( $n = 8$ ), Neoplasmen ( $n = 28$ ), cerebralen Gefäßprozessen ( $n = 2$ ), Schädel-Hirn-Traumen ( $n = 3$ ), metabolischen Myelopathien ( $n = 7$ ), Hydrocephali ( $n = 2$ ) bestimmt.

Referenzpersonen überschritten im Liquor eine Lysozymaktivitätskonzentration von 27000 Lysozymeinheiten pro Liter nicht.

Katalytische Aktivitätskonzentrationen über 105000 Lysozymeinheiten wurden besonders häufig bei bakteriellen Meningoencephaliden beobachtet, aber auch bei anderen nicht bakteriell entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems gefunden. Die Lysozymaktivität im Liquor zeigte keine Korrelation mit den Liquor-Kenngrößen Zellzahl, Albumin. Auch bestand kein Zusammenhang mit der katalytischen Aktivität im Serum. Nur bei bakteriellen Meningoencephaliden konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden für die Zunahme der Lysozymaktivität im Liquor bei Abnahme der Glucosekonzentration.

Die Befunde sprechen für einen Einstrom von Lysozym aus den liquornahen Geweben, in denen es zur Anreicherung von Granulocyten und Makrophagen kommen kann. Die Lysozymaktivität erwies sich als besonders empfindliche Verlaufs-Kenngröße während der Behandlung einer bakteriellen Meningoencephalitis. Die Lysozymaktivität im Liquor fällt mit steigender Antibiotikakonzentration im Liquor ab.

### *Diagnostic Validity of Lysozyme Catalytic Activity in Cerebrospinal Fluid and Serum in Neurologic Diseases*

**Summary:** Lysozyme catalytic activity was determined by lysis of cell-walls of *Micrococcus lysodeicticus*, using the Lysoplate method and turbidimetry. The two methods were compared.

Lysozyme catalytic activity was determined in cerebrospinal fluid and serum of reference persons ( $n = 57$ ) and patients with bacterial meningitis ( $n = 20$ ), viral meningoencephalitis ( $n = 29$ ), multiple sclerosis ( $n = 19$ ), chronic inflammatory diseases ( $n = 29$ ), subarachnoid haemorrhage ( $n = 4$ ), prolaps of the intervertebral disk ( $n = 12$ ), polyneuropathy ( $n = 8$ ), neoplasm ( $n = 28$ ), cerebral angiopathy ( $n = 2$ ), cerebral trauma ( $n = 3$ ), metabolic myelopathy ( $n = 7$ ), hydrocephalus ( $n = 2$ ).

In reference persons lysozyme catalytic activity concentration did not exceed 27000 lysozyme units per liter. Catalytic activity concentration higher than 105000 lysozyme units per liter was very often found in CSF of cases with bacterial meningitis and also in CSF of patients with other, nonbacterial inflammatory diseases of the CNS.

Lysozyme catalytic activity in CSF showed no correlation with cell count and albumin concentration in CSF. There was also no correlation with the lysozyme catalytic activity in serum. Only the CSF of patients with bacterial meningoencephalitis showed a statistically significant correlation between the increase of lysozyme catalytic activity in CSF and the decrease of glucose concentration.

These findings indicate an influx of lysozyme from tissues surrounding the CSF, where granulocytes and macrophages may be enriched.

Lysozyme catalytic activity was a very sensitive parameter during the course of a bacterial meningitis. The enzyme catalytic activity in CSF decreases with increasing concentration of antibiotics in the CSF.

## Einführung

Eine erhöhte Lysozymaktivität im Liquor wurde bei Patienten mit bakteriellen Meningitiden gefunden.

Aber auch andere neurologische Erkrankungen können mit einer erhöhten Lysozymaktivität einhergehen. Bisher ist nicht geklärt, ob dieses Enzym weitgehend von Strukturen des liquornahen Raumes stammt oder ausschließlich aus dem Plasma in den Liquor übertritt. In Liquor und Serum von Referenzpersonen und Patienten mit neurologischen Erkrankungen wurde die Lysozymaktivität gemessen und untersucht auf:

1. die Abhängigkeit zwischen den Kompartimenten Liquor/Serum,
2. die Abhängigkeit zur Albuminkonzentration im Liquor als einer Kenngröße zur Beurteilung der gestörten Blut-Liquor-Schrankenfunktion,
3. den Zusammenhang mit der Zellzahl und der Glucosekonzentration im Liquor.

Die diagnostische Aussagefähigkeit der Lysozymaktivität im Liquor wurde an größeren Patientenkollektiven neurologischer Erkrankungen überprüft.

## Material und Methoden

Durch Lumbalpunktion gewonnene Liquores, eingesandt im Zeitraum von 1980 bis 1981 in das Liquorlabor der Neurologischen Universitätsklinik, wurden in die Untersuchung einbezogen.

Unmittelbar nach der Entnahme der Probe erfolgte die Bestimmung der Zellzahl, die Zentrifugation und die Lagerung bei +4 °C in Polyethylengefäßen (Fa. Eppendorf 3810).

Blut wurde abzentrifugiert und das Serum ebenso behandelt und aufgearbeitet. Spätestens am dritten Tag erfolgte die Bestimmung der Lysozymaktivität.

### Referenzpersonen

Als Referenzpersonen (n = 57) dienten solche Probanden, die zum Ausschluß einer neurologischen Erkrankung punktiert worden waren, der Verdacht sich jedoch nicht erhärten ließ. In diesen Liquorproben betrug die Zellzahl bis 4 Leukocyten pro µl (*Fuchs-Rosenthal*-Zählkammer), die Trübung in der Normomastixreaktion bis Grad V, Gesamteiweiß bis 520 mg/l, Albumin bis 320 mg/l.

### Patienten

Die Patienten wurden nach klinischen Diagnosen geordnet: Bakterielle Meningitiden (n = 20), virale Meningoencephalitiden (n = 29), Multiple Sklerose (n = 19), andere chronische Entzündungen des Zentralnervensystems (n = 29), und andere neurologische Syndrome (Subarachnoidalblutungen n = 4, Discusprotrusionen n = 12, Polyneuropathien n = 8, Neoplasmen n = 28, cerebrale Gefäßprozesse n = 2, Schädel-Hirn-Traumen n = 3, metabolische Myelopathien n = 7, Hydrocephali n = 2).

### Methoden

Die Lysozymaktivität wurde gemessen mit Hilfe der Lyse von Bakterienzellwänden (*Micrococcus lysodeicticus*) durch die Muremidase Lysozym (EC 3.2.1.17). Eine Lysozymeinheit (25 °C; pH 7,0) = ΔA 0,001/min bei 1 cm Schichtdicke. Verglichen wurden ein Diffusionstest und eine turbidimetrische Methode.

Beiden Methoden gemeinsame Reagentien:

Als Substrat dienten Bakterien des Stammes *Micrococcus lysodeicticus* (Fa. Koch-Light Laboratories). Als Standard diente menschliches Lysozym (Fa. Selfact AB., Stockholm).

Als Präzisions- und Richtigkeitskontrolle diente eine unabhängig von den Standardlösungen hergestellte Verdünnung der Standardlösung (Selfact AB., Stockholm).

### Diffusionstest (16)

0,4 g getrocknete Bakterien wurden in 15 ml eines Phosphatpuffers (634 ml 67 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 150 mmol/l NaCl + 390 ml 67 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 150 mmol/l NaCl) über Nacht mit Hilfe eines Magnetrührers bei +4 °C suspendiert. 1 g Agarose (Fa. Behringwerke, Marburg) wurde am folgenden Tag in 50 ml dest. Wasser gelöst unter Rühren und Erwärmen auf 100 °C. Anschließend wurde die Lösung auf 52 °C temperiert. Zu der Agaroselösung wurden 50 ml des ebenfalls auf 52 °C erwärmten Phosphatpuffers (pH = 6,5), versetzt mit 0,2 ml 1-Octanol und 10 mg Thimerosal (Koch-Light-Laboratories), hinzugegeben. Schließlich wurde auch die kurz auf 52 °C erwärmte *Micrococcus*-Suspension hinzugegeben. Jeweils 12 ml dieses Gemisches wurden in Petrischalen (Durchmesser etwa 11 cm) ausgegossen, nach Erkalten Öffnungen ausgestanzt (Durchmesser 4 mm) und je 10 µl der verdünnten Standardlösungen, Serum und Liquor unverdünnt eingefüllt. Nach 24stündiger Inkubation bei +37 °C entstanden Lysehöfe um die Einfüllöffnung, die die Lyse der Bakterien durch das Enzym anzeigten. Der Durchmesser der Lysehöfe verhielt sich proportional zu der Enzymaktivität. An Hand der Verdünnungen der Standardlösung ließ sich eine Standardkurve herstellen (nicht linearer Verlauf) und an dieser die unbekannte Lysozymaktivität in den Proben exakt bestimmen. Die Kalibrierung erfolgte in Lysozymeinheiten. Die untere Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 10000 Lysozymeinheiten pro Liter.

### Turbidimetrischer Test (17)

In einer Lösung aus Phosphatpuffer (67 mmol/l, pH = 6,3) und NaCl (15,4 mmol/l) wurde *Micrococcus lysodeicticus* (0,2 g/l) suspendiert und nach 10 Minuten Temperierung auf +25 °C zur Bestimmung eingesetzt (17). Verwandt wurden Testomar-Testansätze der Fa. Behringwerke, Marburg. 1,5 ml dieser Bakterien-suspension wurden mit 0,025 ml Standardlösung (1:120 = 668300 Lysozymeinheiten pro Liter bis 1:1920 = 41700 Lysozymeinheiten pro Liter = geometrische Verdünnungsreihe) oder Liquor oder Serum vermischt, in jeweils eine auf +25 °C vortemperierte Halbmikroküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen und – beginnend nach 30 Sekunden – 4 Absorptionen, entsprechend 3 Absorptionsdifferenzen im Abstand von 1,5 Minuten gemessen (Wellenlänge 546 nm, Spektrallinienphotometer Eppendorf, Typ 1101 M). Der Mittelwert der Absorptionsdifferenzen wurde ermittelt und – bei den Standardlösungen – gegen die bekannte Enzymaktivität im Koordinatenkreuz aufgetragen. Die so hergestellte Standardkurve hatte einen nicht-linearen Verlauf. Der Mittelwert der Absorptionsdifferenzen unbekannter Proben wurde ebenfalls berechnet und die unbekannte Enzymaktivität an Hand der vorher erstellten Standardkurve abgelesen.

War die mittlere Absorptionsdifferenz größer als 0,1, so wurde die Probe 1:4 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt.

Die Zellzählung erfolgte mit der Zählkammer nach *Fuchs-Rosenthal* (Leukocytenkonzentrationsangabe in n/μl).

Die Glucose wurde in Liquor und Serum bestimmt mit der Glucoseoxidase-Perid-Methode (Präzision von Tag zu Tag = 4%, Richtigkeit von Tag zu Tag = 5%, n = 21). Albumin und IgG wurden quantitativ bestimmt mit der kinetisch immunnephelometrischen Methode (ICS-System, Beckman, Fullerton, Californien – Richtigkeit von Tag zu Tag: Albumin +3%, IgG +3%, (21)).

### Statistische Auswertungen

Die Verteilung der Meßwerte wurde im linearen und logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz überprüft. Um den stochastischen Zusammenhang der klinisch-chemischen Daten zu erkennen, wurde der bivariate Korrelationskoeffizient (*Pearson-r*) errechnet und auf Signifikanz gegen Null geprüft (18).

### Ergebnisse

Zum Vergleich des Diffusionstests und der turbidimetrischen Methode wurden 36 Seren von Patienten nativ eingesetzt. Die Verteilung der Wertepaare gibt Abbildung 1 wieder. Gleichzeitig eingetragen ist die bivariate Regressionsgerade ( $y \approx 0,824x - 13,49$ ). Der Regressionskoeffizient (*Pearson-r*) beträgt 0,95, signifikant auf dem 0,1%-Niveau.

Die Qualitätskontrolle in der Serie ergab einen VK von 0,39% und eine Abweichung vom Sollwert von +1,82% (n = 10) für den Diffusionstest. Für den turbidimetrischen Test lag der VK bei 3,8% und die Abweichung vom Sollwert bei +13,12% (n = 10).

Die Qualitätskontrolle von Tag zu Tag ergab für den Diffusionstest (n = 19) einen VK von 9,06%, die Abweichung vom Sollwert betrug +9,37%.

Die untere quantitative Nachweisbarkeitsgrenze lag bei beiden Methoden bei 10000 Lysozymeinheiten pro Liter. Erkennbare Diffusionsringe unterhalb eines Durchmessers von 4,5 mm konnten jedoch nicht mehr quantitativ ausgewertet werden.

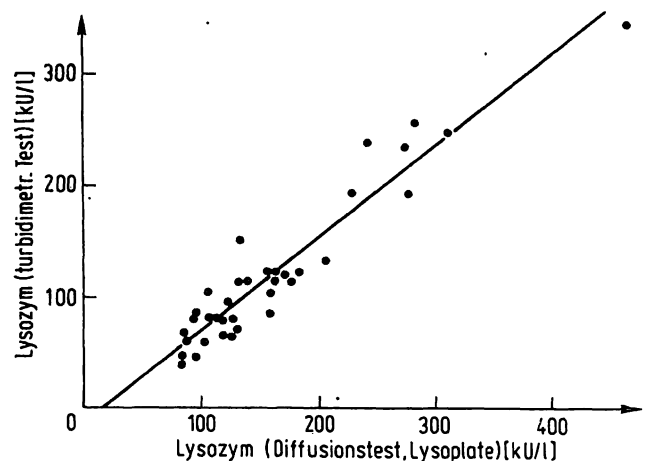


Abb. 1. Wertepaare der Lysozymaktivität gemessen mit dem Lysoplate-Test (Abszisse) und mit der turbidimetrischen Methode (Ordinate). Eingezeichnet ist die bivariate Regressionsgerade ( $y = 0,824x - 13,49$ ). Der Korrelationskoeffizient (*Pearson-r*) beträgt 0,954 (signifikant auf dem 0,1%-Niveau).

Für die Bestimmungen bei Referenzpersonen und Patienten wurde der Diffusionstest eingesetzt.

### Haltbarkeit der Probe

Überprüft an Kontrollen und 5 unbekannten Serumproben ergab sich kein Aktivitätsverlust des Enzyms bei -20 °C bis zum 21. Tag nach Entnahme und kein Aktivitätsverlust bei +4 °C bis zum 3. Tag nach der Probenentnahme.

### Klinisch-chemische Befunde

Abbildung 2 gibt die 95% Vertrauensbereiche von Referenzpersonen und von Patienten mit neurologi-

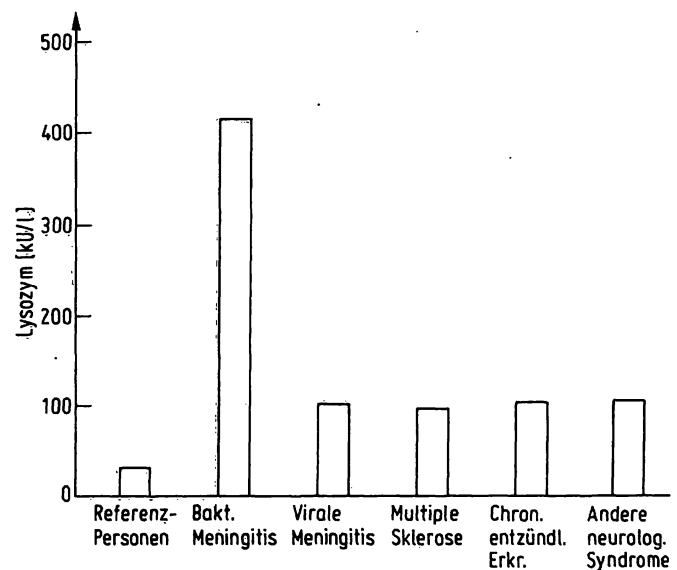


Abb. 2. 95%-Vertrauensbereich der Lysozymaktivität im lumbalen Liquor. Referenzpersonen n = 57, Patienten n = 163. Andere neurologische Syndrome: Subarachnoidalblutungen (n = 4), Discusprotrusionen (n = 12), metabolische Polyneuropathien (n = 8), Neoplasmen (n = 28), cerebrale Gefäßprozesse (n = 2), Schädel-, Hirn-Traumen (n = 3), Myelopathien (n = 7), Hydrocephalus (n = 2).

schen Erkrankungen wieder. Der Referenzbereich reichte bis 27000 Lysozymeinheiten pro Liter. Dieser Referenzbereich wurde bei allen untersuchten Krankheitsgruppen überschritten (Abb. 2). Die Bestimmung der Lysozymaktivität ermöglichte keine Diskriminierung zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen.

Durchschnittlich besonders hoch fiel die Lysozymaktivität bei bakteriellen Meningitiden aus. Werte über 105000 Lysozymeinheiten pro Liter wurden jedoch nicht nur bei bakteriellen Meningitiden, sondern auch bei anderen Erkrankungen des Zentralnervensystems entzündlicher und nicht entzündlicher Genese erreicht (Tab. 1).

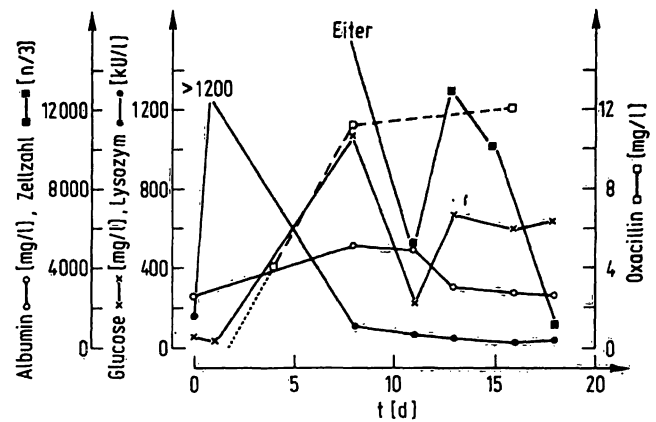


Abb. 3. Konzentrationen im Liquor im Verlauf einer bakteriellen Meningoencephalitis. K.A., 53 Jahre, ♂. Erreger: *Staphylococcus aureus*, antibiotische Therapie: Oxacillin, Gentamycin.

Tab. 1. Patienten mit hoher Lysozymaktivität in lumbal entnommenem Liquor ohne Nachweis einer bakteriellen Erkrankung.

Name	Alter [a]	Ge- schlecht	Lysozym [Lysozym- einheiten pro Liter]	Zellzahl [n/μl]	Albumin [mg/l]	IgG [mg/l]	Glucose [mg/l]	Diagnose
K.K.	40	♂	1200000	2	1068	122	688	Wernicke-Encephalopathie
J.P.	58	♂	330000	—	232	33	—	Hypophysentumor
H.M.	43	♀	1200000	—	176	22	—	Hydrocephalus internus
S.W.	59	♂	1200000	1	180	22	728	Encephalopathie (Alkohol-Abusus)
C.G.	49	♂	390000	1	327	68	523	Cephalgien
S.H.	63	♀	305000	4	123	43	—	Jakob-Creutzfeldt
F.B.	31	♀	690000	3	158	25	588	Encephalopathie nach Prolactinom
S.E.	74	♂	270000	11	7056	1584	448	ungeklärt

*Senkung der Lysozymaktivität im Verlauf einer antibiotisch behandelten bakteriellen Meningoencephalitis*

Abbildung 3 zeigt den Verlauf einer bakteriellen Meningoencephalitis. Zu Beginn der Erkrankung war die Lysozymaktivität niedrig bei eitrigem Liquor. An den folgenden Tagen stieg sie sehr stark an bei gleichzeitigem Beginn einer Antibiotikatherapie. Mit ansteigender Antibiotikakonzentration im Liquor fiel die Lysozymaktivität nahezu spiegelbildlich ab als Hinweis auf einen nicht nur zeitlichen, sondern auch kausalen Zusammenhang. Im Verlauf verhielt sich die Glucosekonzentration im Liquor genau entgegengesetzt zur Lysozymaktivität. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Zellzahl im Liquor und der Lysozymaktivität ließ sich nicht erkennen.

*Zusammenhang zwischen Lysozymaktivität und Glucosekonzentration im Liquor*

In der Gruppe der bakteriellen Meningoencephalitiden fiel die Korrelation der Lysozymaktivität mit der Glucosekonzentration negativ aus. Dieses Ergebnis

war hochsignifikant ( $\alpha = 0,1\%$ ). Es wies auf einen zunehmenden Glucoseverbrauch mit ansteigender Lysozymaktivität hin. Bei den anderen Krankheitsgruppen und bei den Referenzpersonen war ein solcher Zusammenhang nicht nachweisbar (Tab. 2).

*Zusammenhang zwischen der Lysozymaktivität und der Zellzahl im Liquor*

Nur bei Patienten mit viralen Meningoencephalitiden (signifikant  $\alpha = 0,1\%$ ) und bei Patienten mit multipler Sklerose (signifikant  $\alpha = 1,0\%$ ) zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Zellzahl und Lysozymaktivität im Liquor mit hoher Signifikanz (Tab. 3).

*Zusammenhang zwischen der Lysozymaktivität und der Albuminkonzentration im Liquor*

Bei Referenzpersonen und Patienten konnte kein Zusammenhang ermittelt werden zwischen der Lysozymaktivität und der Albuminkonzentration im Liquor (Tab. 4).

Tab. 2. Glucose und Lysozymaktivität in lumbal entnommenem Liquor bei Referenzpersonen und bei Patienten mit neurologischen Syndromen. n = Zahl der Fälle,  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$  = Mittelwert,  $s_x$ ,  $s_y$  = einfache Standardabweichung, r = Korrelationskoeffizient (Pearson-r),  $\alpha$  = Irrtumswahrscheinlichkeit. Andere neurologische Syndrome (n = 51): Subarachnoidalblutungen (n = 4), Discusprotrusionen (n = 12), metabolische Polyneuropathien (n = 8), Neoplasmen (n = 28), cerebrale Gefäßprozesse (n = 2), Schädel-Hirn-Traumen (n = 3), Myelopathien (n = 7), Hydrocephalus (n = 2).

Probanden	n	Glucose im Liquor [mg/l]		Lysozym im Liquor [Lysozymeinheiten pro Liter]		Regression			Korrelation signifikant $\alpha = 0,1\%$
		$\bar{x}$	$s_x$	$\bar{y}$	$s_y$	r	$a_0$	$a_1$	
<i>Referenzpersonen</i>	12	600,42	90,87	15630	4850	-0,132	19,85	-0,01	nein
<i>Patienten</i>									
Bakt. Meningitis	15	464,40	156,59	207600	304610	-0,875	997,58	-1,70	ja
Virale Meningitis	13	572,69	82,66	36150	30200	-0,457	131,81	-0,17	nein
Multiple Sklerose	13	574,23	75,85	42230	34660	0,071	23,63	0,03	nein
Chron. entzündl. Erkrankungen	16	591,13	22,78	37380	21730	0,453	-217,98	0,43	nein
Andere neurologische Syndrome	20	575,25	90,30	43950	26920	0,035	37,97	0,01	nein

Tab. 3. Zellzahl und Lysozymaktivität in lumbal entnommenem Liquor bei Referenzpersonen und bei Patienten mit neurologischen Syndromen.

Probanden	n	Zellzahl im Liquor [n/ $\mu$ l]		Lysozym im Liquor [Lysozymeinheiten pro Liter]		Regression			Korrelation signifikant	
		$\bar{x}$	$s_x$	$\bar{y}$	$s_y$	r	$a_0$	$a_1$	$\alpha = 0,1\%$	$\alpha = 1,0\%$
<i>Referenzpersonen</i>	19	2	1	17110	4910	-0,163	18,41	-0,51	nein	nein
<i>Patienten</i>										
Bakt. Meningitis	16	632	1259	164310	144790	-0,040	167,19	-0,00	nein	nein
Virale Meningitis	20	30	58	42750	32300	0,756	30,18	0,14	ja	ja
Multiple Sklerose	15	9	11	38800	33340	0,643	21,39	0,65	nein	ja
Chron. entzündl. Erkrankungen	29	7	11	45540	29590	-0,050	45,35	-0,04	nein	nein
Andere neurologische Syndrome	32	2	3	49720	38060	0,114	45,94	0,50	nein	nein

Tab. 4. Albuminkonzentration und Lysozymaktivität in lumbal entnommenem Liquor bei Referenzpersonen und bei Patienten mit neurologischen Syndromen.

Probanden	n	Albumin im Liquor [mg/l]		Lysozym im Liquor [Lysozymeinheiten pro Liter]		Regression/Korrelation	
		$\bar{x}$	$s_x$	$\bar{y}$	$s_y$	r	signifikant $\alpha = 5\%$
<i>Referenzpersonen</i>	21	158,33	60,18	16740	4950	0,403	nein
<i>Patienten</i>							
Bakt. Meningitis	20	1676,70	2261,16	150750	132960	-0,000	nein
Virale Meningitis	29	593,28	577,76	38970	31120	0,266	nein
Multiple Sklerose	19	236,21	147,85	38260	30570	0,043	nein
Chron. entzündl. Erkrankungen	28	326,25	242,60	44290	29790	-0,047	nein
Andere neurologische Syndrome	51	547,33	858,80	44390	31230	-0,061	nein

### Zusammenhang der Lysozymaktivität in Liquor und Serum

Abbildung 4 gibt die Wertepaare der Lysozymaktivitäten in Liquor und Serum wieder von Referenzpersonen und von Patienten. Ein Zusammenhang ließ sich optisch nicht erkennen. Die Fälle mit einer erheblichen Störung der Blut-Liquor-Schranke, kenntlich an einer hohen Albuminkonzentration im Liquor und niedriger Zellzahl, wurden besonders gekennzeichnet. Ein optischer Zusammenhang dieser Wertepaare ließ sich ebenfalls nicht erkennen.

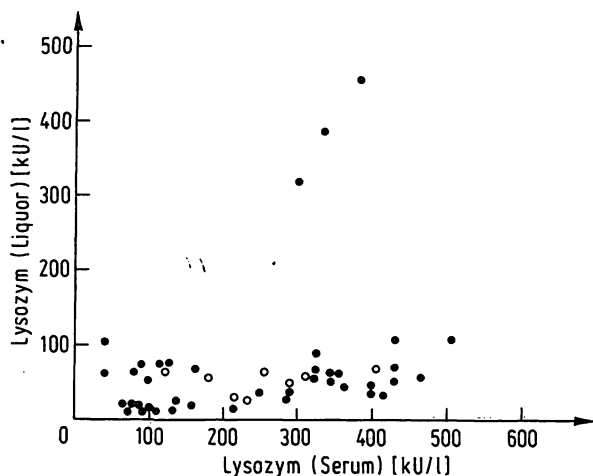


Abb. 4. Korrelation von Lysozymaktivität in Liquor und Serum. ○ = Patienten mit Störungen der Blut-Liquor-Schranke (n = 8), ● = Referenzpersonen (n = 6) und Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen (n = 34).

### Diskussion

#### Methoden

Die Bestimmungen der Lysozymaktivität in Liquor und Serum haben hinsichtlich

- der Normbereichsgrenzen,
- der Qualität und Richtigkeit in Abhängigkeit von den zugrunde liegenden Substraten und Meßverfahren
- sowie in den Angaben der katalytischen Aktivität in Einheiten oder Gewicht pro Volumeneinheit

zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt (13, 7, 9). Aus diesem Grunde wurden zwei Methoden – der Diffusions- und Lysetest in Agargel (lysoplate-method, 16) und eine turbidimetrische Methode (17) miteinander verglichen.

Beiden Methoden gemeinsam ist die Quantifizierung der Lysozymaktivität durch Lyse von Bakterienzellwänden, in denen als Substrat Peptidoglycan enthal-

ten ist (20). Die Qualitäts- und Richtigkeitskontrollen der Methoden lieferten Ergebnisse, die vergleichende Untersuchungen zuließen. Die untere Nachweisbarkeitsgrenze von 10 000 Lysozymeinheiten pro Liter machte nicht in jedem Falle eine quantitative Bestimmung der Lysozymaktivität im Liquor möglich. In allen Liquorproben konnte mit dem Diffusionstest ein kleiner Lysehof um die Einfüllöffnung nachgewiesen werden. Dieser war jedoch unterhalb eines Durchmessers von 4,5 mm quantitativ nicht auswertbar. In den Serumproben war die Bestimmung der Lysozymaktivität in jedem Fall möglich. Die Korrelation beider Meßmethoden unter Einsatz von Serumproben ergab einen *Pearson-r* von 0,95 bei einer Signifikanz von  $\alpha = 0,1\%$  als Hinweis auf eine gute Übereinstimmung beider Methoden, während der Verlauf der Regressionsgeraden auf Unterschiede im Meßergebnis hinweist (Abb. 1). Bei gleichem Substrat (*Micrococcus lysodeicticus*) und demselben Humanlysozym-Material sowie gleichem Puffer ergeben sich die Unterschiede in beiden Methoden in einer Zeitdifferenz (Einwirkzeit des Enzyms) und in einer Temperaturdifferenz:

- 1,5 Minuten (Mittelwertberechnung von 3 Absorptionsdifferenzen) bei 25 °C = turbidimetrische Messung
- und einer Einwirkzeit von 24 Stunden bei 37 °C = Diffusion im Agargel.

Auf Grund der besseren Präzision und Richtigkeit des Diffusionstestes gegenüber dem turbidimetrischen Test in der Serie und der guten Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag (vergleiche Ergebnisse) wurde zur Erstellung des Referenzbereichs und der Untersuchung von Liquores und Seren von Patienten der Diffusionstest herangezogen.

Eine Lysozym-Einheit des als Standard verwandten Humanlysozyms (Fa. Selfact AB., Stockholm) war definiert als Abnahme von 0,001 Absorptionseinheiten pro Minute bei 1 cm Schichtdicke der Küvetten bei einer *Micrococcus*-Suspension in 100 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Puffer, pH = 7,0 bei 25 °C (19). Unter diesen Bedingungen erhielt das gefriergetrocknete Humanlysozym der Fa. Selfact, Stockholm bei einem Reinheitsgrad von 75–85%: 40 100 Lysozymeinheiten pro mg Trockengewicht.

Die hier zugrunde gelegten Referenzwerte wurden auf Humanlysozymaktivität bezogen. Die Werte des Referenzkollektivs erstreckten sich bis 27 000 Lysozymeinheiten pro Liter (Abb. 2, Tab. 4).

#### Referenzpersonen

Grundlage für die Ermittlung von Referenzbereichen waren Patienten, die wegen eines Verdachtes

auf eine neurologische Erkrankung punktiert wurden. Letztere konnte ausgeschlossen werden. Damit handelte es sich im strengen Sinne nicht um „Normalpersonen“ (1).

Sämtliche klinisch-chemischen Kenngrößen lagen im Normbereich. Als Referenzbereich wurde der 95%-Vertrauensbereich herangezogen (Tab. 2, 3, 4).

### Patienten

Besonders hohe Lysozymaktivitäten im Liquor wurden bei bakteriellen Meningitiden mitgeteilt. Dieses wurde als diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer bakteriellen Meningitis angesehen (4, 5). Beim Vergleich mit Kollektiven neurologischer Erkrankungen anderer Genese sind Lysozymaktivitäten oberhalb von 105000 Lysozymeinheiten pro Liter (Human-Lysozym) mit hoher Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Meningitis zuzuordnen (Abb. 2). Jedoch ist ein solches Ergebnis für eine bakterielle Meningitis nicht spezifisch, da auch bei andersartigen neurologischen Erkrankungen hohe Aktivitäten gemessen werden konnten (Tab. 1). Damit kann vermutet werden, daß auch andere Noxen als Bakterien die Lysozymaktivität im Liquor steigern können.

Lysozym stammt vorwiegend aus dem Stoffwechsel von Makrophagen, neutrophilen Granulocyten und deren Vorstufen direkt aus dem Knochenmark und aus Monozyten (10, 8, 15). Hingegen weisen RES-Zellen und lymphoide Zellen nur eine sehr geringe Lysozymaktivität auf, die für unsere Betrachtungen kaum ins Gewicht fallen dürften (3). Lysozym, von Leukocyten, Makrophagen, Monocyten stammend, könnte demnach aus liquornahen Räumen in den Liquor gelangen oder im Liquor selbst gebildet werden (2). Andererseits wäre ein Übertritt aus dem Plasma – ähnlich dem Albumin –, das ausschließlich in der Leber gebildet wird, denkbar (9).

Ein Zusammenhang der Lysozymaktivität im Liquor mit der Zellzahl (Leukocytenkonzentration) konnte gerade für bakterielle Meningitiden nicht nachgewiesen werden, obwohl hier ein besonders hoher Zellanteil neutrophiler Granulocyten im Liquor vorliegt (6, 9, Tab. 3). Dagegen ergab sich eine signifikante Korrelation der Wertepaare von Patienten mit viralen Meningoencephalitiden und mit multipler Sklerose (Tab. 3). Bei diesen Erkrankungen handelt es sich aber vorwiegend um eine Vermehrung lymphoider Zellen im Liquor, so daß der Zusammenhang mit der Zellzahl im Liquor nicht als unmittelbar kausal anzusehen ist. Ein Zusammenhang mit einer Lysozymproduktion in den liquornahen Räumen des ZNS durch dort angereicherte neutrophile Granulocyten und Makrophagen in den infiltrierten Herden muß vermutet werden. Eine solche An-

reicherung von Lysozym-produzierenden Zellen zeigt sich aber auch bei nicht-bakteriellen Erkrankungen des Zentralnervensystems, möglicherweise als Zeichen der sekundären entzündlichen Zellreaktion, die sich dem Liquor nicht mitteilt (Tab. 3).

Da Erkrankungen des ZNS häufig mit einer Schrankenstörung zwischen Blut und Liquor einhergehen, wurde der Übertritt von Lysozym aus dem Serum vermutet und eine Abhängigkeit der Lysozymaktivität im Liquor von der des Serums angenommen (9, 14). Eine Abhängigkeit der Lysozymaktivität zwischen den Kompartimenten Serum und Liquor ließ sich weder für die Gesamtzahl der untersuchten Fälle noch für die nicht-entzündlichen Erkrankungen erkennen, die mit einer Schrankenstörung zwischen Blut und Liquor einhergehen, ohne Vermehrung der Leukocytenzahl im Liquor (Abb. 4). Auch bestand keine statistische Korrelation als Hinweis auf einen gleichzeitigen Übertritt mit Albumin aus dem Plasma (Tab. 4). Demnach verhielten sich die Lysozymaktivitäten in beiden Kompartimenten unabhängig voneinander. Dieses schließt unterschiedliche Mechanismen der Hemmung der Lysozymaktivität nicht aus (12). Eine gleichzeitige Bestimmung in Liquor und Serum ist aus diagnostischen Gründen nicht erforderlich.

Bei bakteriellen Meningoencephalitiden nahm der Glucosegehalt des Liquors ab, als Auswirkung eines erhöhten Verbrauchs durch den Stoffwechsel von Bakterien und Zellen (11). Die negative, statistisch signifikante Korrelation des Glucosegehaltes mit der Lysozymaktivität im Liquor (Tab. 2) bei fehlender Korrelation mit dem Zellgehalt im Liquor selbst (Tab. 3) spricht für den Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel in den liquornahen Räumen. Das Lysozym könnte demnach aus Zellen stammen, die in liquornahen Räumen an der bakteriell entzündlichen Reaktion beteiligt sind.

Die Lysozymaktivität des Liquors sank während der Behandlung einer bakteriellen Meningoencephalitis mit steigender Antibiotikakonzentration schneller ab, als die Glucosekonzentration des Liquors anstieg (Abb. 3). Die Vermutung liegt nahe, daß die Lysozymaktivität im Liquor ursächlich durch das Antibiotikum beeinflusst wurde infolge der bakteriziden bzw. bakteriostatischen Wirkung und so eine Kenngröße für die Wirksamkeit der Antibiotikatherapie sein könnte. Ähnliche Beobachtungen teilte Gekle et al. (5) mit bei der Untersuchung von Patientenkollektiven mit bakterieller Meningitis. Auch unter Azathioprintherapie nach Nierentransplantation wurde eine im Zusammenhang mit der Behandlung sinkende Lysozymkonzentration im Serum mitgeteilt (10).

## Literatur

1. Büttner, H. (1973) In: Optimierung der Diagnostik (Lang, H., Rick, W. & Roka, L., eds.) Springer Berlin, Heidelberg, New York, pp. 233–241.
2. Dick, W., Braun, O. H., Nagel, W. & Theilmann, L. (1980) Monatsschr. Kinderheilk. 128, 472–475.
3. Finch, S. C., Castro, O., Lippman, M. E., Donadiou, I. A. & Perillie, P. E. (1974) In: Lysozyme (Osserman, E. F., Canfield, R. E. & Beychok, S., eds.) Academic Press, New York, London, pp. 335–345.
4. Gekle, D., Kult, J. & Roth, R. (1977) Klin. Wochenschr. 55, 189–191.
5. Gekle, D., Kult, J. & Roth, R. (1980) Lab. Med. 4, 71–74.
6. Grossgebauer, K., Pohle, H. D. & Langmaack, H. (1968) Klin. Wochenschr. 46, 1127.
7. Hansen, N. E., Karle, H., Andersen, V. & Ølgaard, K. (1972) J. Clin. Invest. 51, 1146–1155.
8. Hansen, N. E. & Andersen, V. (1973) Brit. J. Haematology 24, 613.
9. Hansen, N. E., Karle, H., Jensen, A. & Bock, E. (1977) Acta Neurol. Scand. 55, 418–424.
10. Horpacsy, G., Zinsmeyer, J., Schröder, K. & Mebel, M. (1978) Clin. Chem. 24, 74–79.
11. Kauerz, U., Weisner, B., Bernhardt, W. & Rehpenning, W. (1982) Nervenarzt 53, 91–97.
12. Kauerz, U. & Weisner, B. (1981) In: Berichte der ÖGKG, III. International Congress of Clinical Enzymology, Salzburg, Sept. 6–9, Jahrg. 4, Heft 3, p. 133.
13. Kleine, T. O. (1979) In: Bericht über die Kleinkonferenz der Deutschen Ges. f. Klin. Chemie am 13. und 14. Oktober 1978 in Marburg/Lahn, (1978) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 506.
14. Kleine, T. O. (1980) In: Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Kleine, T. O. Hrsg.) Thieme Verlag Stuttgart, New York, pp. 59–69.
15. Ohta, H. & Osserman, E. F. (1972) Tohoku J. Exp. Med. 107, 229.
16. Osserman, E. F. & Lawlor, D. P. (1966) J. Exp. Med. 124, 921–952.
17. Prokop, D. J. & Davidson, W. D. (1964) New Engl. J. Med. 270, 269–274.
18. Sachs, L. (1969) Statistische Auswertungsmethoden, Springer Berlin, Heidelberg, New York, pp. 80–81.
19. Shugar, D. (1952) Biochim. Biophys. Acta 8, 302–309.
20. Strominger, J. L. & Tripper, D. J. (1974) In: Lysozyme, (Osserman, E. F., Canfield, R. & Beychok, S., eds.), Academic Press, New York, London, pp. 169–184.
21. Weisner, B. & Kauerz, U. (1979) Medizintechnik 3, 89–92.

PD Dr. B. Weisner  
Neurologische Universitätsklinik  
und Poliklinik  
Martinistr. 52  
D-2000 Hamburg 20